

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ БЕТА-ПРОПИОЛАКТОНА С ПОМОЩЬЮ lux-БИОСЕНСОРОВ *E. coli* И НЕМАТОДЫ *Caenorhabditis elegans*

© 2023 г. Э. А. Мачигов¹, С. К. Абилов^{1, 2, *}, Е. В. Игонина¹, М. В. Марсова²

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 12.10.2022 г.

После доработки 01.11.2022 г.

Принята к публикации 02.11.2022 г.

Впервые применены lux-биосенсоры *E. coli* и нематоды *Caenorhabditis elegans* для исследования генотоксичности бета-пропиолактона (БПЛ), используемого в производстве инактивированных вирусных вакцин в качестве инактиватора. Показано, что ДНК-повреждающая активность БПЛ обусловлена не только его способностью связываться с ДНК бактерий, но и способностью генерировать в клетке такие активные формы кислорода как супероксид-анион и перекись водорода, обладающие генотоксической активностью. Обнаружено, что БПЛ доза-зависимым образом, начиная с концентрации 0.001 моль/л, снижает выживаемость бактерий. Однако при этом усиливалась интенсивность экспрессии гена антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы *soxS* и гена репарации ДНК *colD*. БПЛ индуцировал в клетках нематоды разрывы ДНК, выявляемые методом электрофореза. Антиоксидант ацетилцистеин снижал генотоксические эффекты БПЛ как у бактерий, так и у нематод.

Ключевые слова: бета-пропиолактон, lux-биосенсоры, *E. coli*, нематода *Caenorhabditis elegans*, генотоксичность, супероксид-анион, разрывы ДНК, антиоксидант, ацетил цистеин.

DOI: 10.31857/S0016675823040070, **EDN:** AVYSFU

Бета-пропиолактон (БПЛ) является промышленно важным химическим соединением. С 1953 по 1973 гг. его использовали для производства акриловой кислоты [1–3], позже был предложен новый метод синтеза акриловой кислоты и объемы производства БПЛ в мире сократились. Кроме применения в химической промышленности БПЛ используется для стерилизации: хирургических инструментов, плазмы крови, тканевых трансплантатов, молока, воды, питательного бульона и ферментов [2–5]. В 1974 г. Международное агентство по исследованию рака (IARC) включило БПЛ в группу 2А возможных канцерогенов для человека по результатам изучения его способности индуцировать рак у мышей и крыс при различных способах воздействия [1–4].

БПЛ является высоко реакционноспособным соединением, для которого характерны реакции с раскрытием четырехчленного цикла, вследствие напряженности связей в нем. При раскрытии цикла БПЛ образуется электрофильное производное, обладающее сильными бактерицидными свойствами. В связи с этим, БПЛ широко применяют и в настоящее время для стерилизации крови, фер-

ментов, а также в качестве инактиватора в производстве инактивированных вирусных вакцин [1, 2] наряду с формальдегидом [1, 3]. Способность БПЛ в первую очередь взаимодействовать с ДНК или РНК предполагает, что иммуногенные эпителии белка вируса будут повреждены незначительно в отличие от инактивации формальдегидом [3–5].

Генотоксичность БПЛ как алкилирующего агента, изучается с 60-х годов XX в. Было показано, что БПЛ быстро вступает в реакцию с нуклеофильными центрами белков и нуклеиновых кислот. В белках БПЛ преимущественно связывается с серосодержащими аминокислотами [6]. В ДНК БПЛ реагирует с гуанином, образуя 7-(2-карбоксиэтил)гуанин, с аденином реагирует в меньшей степени, преимущественно в положении N3 его молекулы [7]. Алкилирование гуанина может привести либо к депуринизации, либо к образованию ионизированной формы молекулы, способной к неправильной водородной связи с тиминам. Это может привести к мутациям замены пары оснований GC на AT.

Токсические и мутагенные эффекты БПЛ были изучены в лимфоблестах человека и у бактерий *Salmonella typhimurium* методом определения количества модифицированного гуанина. Клетки *S. typhimurium* были в 25 раз более чувствительны к БПЛ, чем клетки человека [8]. У *Drosophila melanogaster* БПЛ индуцировал рецессивные летальные мутации, связанные с полом, аутосомные транслокации и разрывы хромосом [9]. В тесте Эймса БПЛ индуцировал мутации замены пар оснований у двух штаммов и сдвиг рамки считывания у пяти штаммов *S. typhimurium*. При этом антиоксиданты — витамин С, витамин Е, селен и бутилированный гидрокситолуол, заметно снижали мутагенез, происходящий по механизму сдвига рамки считывания [10]. БПЛ индуцировал микроядра в клетках селезенки мышей *in vivo* [11] и проявил мутагенную активность на клеточных линиях V79 и g12 (трансгенная клеточная линия) [12]. Основные итоги исследования генетических свойств приведены в обзорах [5, 13].

Было проведено исследование потенциальной генотоксичности БПЛ на предимплантационных эмбрионах мышей *in vivo*. Для этого самкам на разных стадиях мейоза путем инъекции вводили БПЛ в разное время после индукции суперовуляции. Анализ мужских и женских хромосомных комплектов перед сингамией, полученных от эмбрионов с первым расщеплением, не выявил цитогенетических нарушений [14].

Для определения потенциальной органной специфичности генотоксического воздействия БПЛ *in vivo* использовали трансгенную модель мыши Muta™ Mouse, которая содержит несколько копий репортерного гена *lacZ* в одном локусе на хромосоме 3. Авторы выделяли ДНК из интересующих тканей, затем вырезали репортерный ген и вставляли в фаговые частицы. Далее заражали этими фаговыми частицами бактерии *E. coli*, у которых отсутствует функциональный ген *lacZ*, далее проводили позитивную селекцию для определения частоты мутаций *lacZ*⁺. Через семь дней после однократного перорального введения мышам БПЛ (150 мг/кг) частота мутаций в желудке мыши Muta увеличилась в 8.8 раз по отношению к контролю, однако в печени мыши этот показатель составил 1.8 [15].

В экспериментах на крысах *in vivo* способность БПЛ связываться с ДНК слизистой носа хорошо соответствовала его канцерогенному потенциалу в носу крыс [16]. Результаты экспериментов *in vivo* указывают на то, что БПЛ не проявляет системного генотоксического и канцерогенного эффектов, чаще всего эти эффекты проявляются по месту введения. Например отмечено отсутствие системной неоплазии в результате подкожного или перорального воздействия БПЛ на животных [4]. Период полураспада БПЛ *in vivo* вероятно слишком

короток для того, чтобы значительное количество активной формы достигло любого целевого участка.

Цель данной работы — изучение генотоксичности БПЛ с помощью lux-биосенсоров *E. coli*, несущих плазмиду с промоторами индуцибельных генов SOS-ответа и генов окислительного стресса, слитыми с lux-опероном, у нематоды *Caenorhabditis elegans*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические препараты. Все использованные химические вещества были аналитической чистоты. β-Пропиолактон был приобретен у фирмы “Sigma Aldrich” (США), N-ацетилцистеин (АЦЦ) приобрели у компании “Serva” (Германия). Все необходимые разведения веществ готовились *ex tempore*.

Штаммы lux-биосенсоров. В работе использовали lux-биосенсоры на основе штамма *E. coli* K12: pColD-lux, pRecA-lux, pAlkA-lux, pSoxS-lux и pKatG-lux. Данные биосенсоры содержат рекомбинантную плазмиду, включающую промоторы генов репарации и SOS-ответа: *recA*, *alkA* и *colD*; промоторы генов супероксиддисмутазы *soxS* и каталазы *katG*, слитые с lux-опероном *Photobacterium luminescens*. Генотип штамма *E. coli* K12 MG1655 и конструкции рекомбинантных плазмид описаны ранее [17–19]. Перечисленные биосенсоры предоставлены Г.Б. Завильгельским и И.В. Мануховым (ГосНИИгенетика, Москва).

Хранение и культивирование бактериальных культур осуществляли с помощью питательных сред LB (Луриа–Бертани), жидких и твердых, с добавлением агара. Среда содержала ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Для опытов использовали культуры биосенсоров pRecA-lux, pColD-lux, pAlkA-lux pKatG-lux и pSoxS-lux в жидкой питательной среде LB.

Регистрация люминесцентного ответа биосенсоров. Ночные культуры биосенсоров разбавляли в свежей жидкой среде LB, доводя содержание бактерий до концентрации 10⁷ кл/мл, и инкубировали при 37°C в течение 120 мин с аэрацией до достижения ранней экспоненциальной фазы. Далее культуры переносили в 96-луночный планшет по 160 мкл в каждую лунку. Ряд контрольного образца заполняли дистиллированной водой по 40 мкл в лунку, следующие же ряды лунок заполняли по 20 мкл воды в каждую лунку и по 20 мкл различных разведений БПЛ. В экспериментах по изучению влияния антиоксидантов на действие БПЛ вместо дистиллированной воды в лунку добавляли по 20 мкл раствора АЦЦ. Далее, культуры в заполненных планшетах культивировали течение 1 ч при 37°C и определяли интенсивность люминесценции биосенсоров с помощью люминометра —

микропланшетного ридера StatFax 4400, Awareness Technology Inc. (США), где за единицу измерения для люминесцентного ответа принимали условные единицы светового потока (RLU). Вышеперечисленные опыты проводили не менее трех раз с восемью повторениями в каждом.

Тест на разрывы ДНК методом гель-электрофореза. Ночные культуры биосенсоров разбавляли в свежей жидкой среде LB, доводя содержание бактерий до концентрации 10^7 кл/мл. Затем инкубировали при 37°C в течение 120 мин с аэрацией до достижения ранней экспоненциальной фазы. Далее, по 1 мл различных разведений БПЛ и по 1 мл раствора АЦЦ добавляли в 10 мл бактериальной культуры и культивировали в течение 1.5 ч при 37°C, после этого бактерии отмывали изотоническим физиологическим раствором путем центрифугирования. После очередного центрифугирования и слива супернатанта растворяли осадок пипетированием в 350 мкл лизирующего раствора (0.1 ммоль/л ЭДТА, 0.5 М NaOH, 0.05% SDS). Далее выдерживали в лизирующем растворе в течение 1.5 ч при 37°C. Затем 35 мкл лизированной бактериальной культуры добавляли в лунки 1%-ной агарозной пластины, содержащей бромид этидия в концентрации 10 мкл/100 мл. Леддер помещали в первую лунку в объеме 5 мкл. Далее агарозная гелевая пластина устанавливалась в ванночке для электрофореза, наполненной TBE-буфером. Электрофорез проводился в течение 1.5 ч при 100 В. На последнем этапе с помощью трансиллюминатора Vilber Lourmat serial N 10 102939 (Франция) осуществляли визуализацию флуоресцирующих штрихов ДНК под действием УФ-излучения.

Культивирование нематод. В работе использовали нематод *Caenorhabditis elegans* Bristol N2, которых выращивали при 21°C на твердой агарозной NGM-среде. В качестве питания использовали *E. coli* OP50 в виде газона по описанному методу [20].

Для синхронизации поколения разросшуюся на чашке Петри популяцию нематод пипетировали стерильной водой до получения взвеси нематод и яиц. Переносили 3.5 мл взвеси в пробирку и добавляли 1.5 мл свежеприготовленной смеси (0.5 мл 5 М NaOH + 1 мл 5% HClO₄). Перемешивали и вортиксовали 10 мин, а затем центрифугировали 30 с при 1300 g и удаляли супернатант. Затем промывали осадок, добавляя 5 мл воды, центрифугируя и удаляя супернатант. Промывку повторяли три раза. Затем 0.1 мл суспензии яиц нематод переносили на чашку с NGM-агаром и газоном *E. coli* OP50. Выращивание синхронизированных нематод проводили при 20°C в течение трех суток до достижения стадии L4 ("young adult").

Проведение эксперимента и выделение ДНК нематод. Для проведения эксперимента червей смыли с чашек стерильной водой в 1.5-мл пробирки,

осаждали на вортексе и сливали супернатант. К осадку добавляли БПЛ в разных концентрациях, пипетировали до образования взвеси и инкубировали 120 мин при 21°C. Затем взвесь нематод центрифугировали 5 мин при 2300 g и удаляли супернатант, добавляли 1 мл стерильной воды и пипетировали до получения взвеси. Далее нематод промывали с целью освобождения кишечника червей от бактерий. Для этого взвесь сливали в пробирки по 15 мл, добавляли воду до достижения 5 мл и центрифугировали 5 мин при 2300 g для образования гранул. Супернатант отбрасывали и заменяли свежей стерильной водой. Пробирки, содержащие нематоды, вортиксовались 3 мин; после этого червей центрифугировали 5 мин при 2300 g для удаления бактерий. Промывку повторяли десять раз, чтобы вымыть бактерии из кишечника нематод. При последней промывке избыток воды удаляли, оставляя 1 мл смеси вода/нематоды, а затем переносили в 1.5-мл микроцентрифужные пробирки и центрифугировали при 12 100 g в течение 10 мин. Супернатант сливали, а гранулу подвергали заморозке при -20°C, после чего механически измельчали палочкой с абразивной поверхностью наконечника.

Далее выделение ДНК проводили с использованием специального набора реагентов по протоколу Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) следующим образом. 1. Не дожидаясь оттаивания измельченной гранулы, добавляли к ней 200 мкл ТЕ-буфера, 400 мкл лизирующего раствора, и инкубировали при 65°C в течение 10 мин. 2. Затем добавляли 600 мкл хлороформа, переворачивали пять раз и центрифугировали 2 мин при 10000 об./мин. 3. Верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, переносили в новую пробирку и добавляли 800 мкл 1%-ного осаждающего раствора, перемешивали несколькими переворотами в течение 2 мин и центрифугировали 2 мин при 10000 об./мин. 4. Удаляли супернатант и растворяли гранулу в 100 мкл раствора хлорида натрия осторожным встряхиванием. 5. Добавляли 300 мкл холодного этанола, осаждали ДНК при -20°C в течение 10 мин, затем центрифугировали 4 мин при 10000 об./мин, удаляли этанол, обливали гранулу 70%-ным этанолом, добавляли к ней 200 мкл стерильной деионизированной воды и растворяли гранулу в воде аккуратным встряхиванием. Перечисленные процедуры проведения эксперимента и выделения ДНК нематод для электрофореза описаны в [21].

Для электрофореза 1%-ную агарозную гелевую пластину (0.01% бромид этидия) помещали в ванночку с 10%-ным TBE-буфером и переносили в лунки по 20 мкл лизированной ДНК нематод. Электрофорез проводили при 100 мА, 120 В, 80 Вт. Визуализацию результатов электрофореза ДНК нематод осуществляли с помощью трансиллюминатора.

Таблица 1. Зависимость интенсивности люминесценции биосенсоров от концентрации БПЛ

Вариант	Интенсивность люминесценции биосенсоров, отн. ед.				
БПЛ, моль/л	pSoxS-lux	pColD-lux	pRecA-lux	pKatG-lux	pAlkA-lux
0 (вода)	1536 ± 33	969 ± 50	20218 ± 57	2737 ± 77	95 ± 1.30
0.000015	1570 ± 20	840 ± 35	21 559 ± 548	2771 ± 80	90 ± 1.32
0.00015	2202 ± 38 (3.3E-19)	974 ± 41	29798 ± 662 (1.6E-15)	2812 ± 95	96 ± 1.08
0.0003	2807 ± 55 (9.5E-28)	1028 ± 50	32771 ± 711 (8.2E-20)	2955 ± 98	91 ± 1.08
0.00075	4223 ± 111 (1.3E-31)	1422 ± 93 (9.5E-5)	39384 ± 679 (1.0E-29)	3014 ± 119	82 ± 1.42
0.0015	5244 ± 175 (5.8E-29)	1749 ± 143 (4.8E-6)	404087 ± 777 (5.4E-29)	3201 ± 122 (0.003)	71 ± 1.30
0.003	3804 ± 136 (2.9E-23)	1296 ± 96 (4.6E-3)	35727 ± 652 (2.3E-25)	3053 ± 113 (0.03)	46 ± 1.22
0.0075	972 ± 30	572 ± 23	17013 ± 504	1920 ± 35	11 ± 0.72
Положительный контроль	14927 ± 296 (диоксидин 0.001 M)	8185 ± 419 (диоксидин 0.001 M)	67673 ± 1386 (диоксидин 0.001 M)	38946 ± 932 (H ₂ O ₂ 0.001 M)	2998 ± 33.3 (ММС 0.005 M)

Примечание. В скобках приведены значимость различий между контрольными и опытными вариантами в случаях увеличения эффекта.

Статистическая обработка. Полученные в ходе опытов данные обработали стандартными статистическими методами. Вычисляли средние значения показателя и его ошибки. Значимость различий средних значений определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для вывода о статистической значимости различий полученных данных, считали достаточной вероятность ошибки $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение зависимости интенсивности люминесценции биосенсоров pSoxS-lux, pRecA-lux, pColD-lux, pKatG-lux и pAlkA-lux от концентраций БПЛ показало, что БПЛ в бактериальной клетке увеличивает концентрацию таких оксидантов, как супероксид-анион и пероксид водорода, регистрируемые биосенсорами pSoxS-lux и pKatG-lux, а также вызывает повреждения в ДНК, регистрируемые биосенсорами pRecA-lux и pColD-lux. Биосенсор pAlkA-lux, откликающийся на действие алкилирующих химических соединений, не показал увеличения интенсивности люминесценции при действии БПЛ, однако при действии монофункционального алкилирующего соединения ММС в концентрации 0.01 моль/л увеличил уровень своей люминесценции с 95 (в контроле) до 2998 усл. ед., то есть более, чем в 30 раз (табл. 1). Полученные результаты указывают на то, что БПЛ генерирует в бактериях *E. coli* такие оксидативные соединения, как супероксид-анион и (в

гораздо меньшей степени) пероксид водорода, а также вызывает SOS-ответ.

На рис. 1 и 2 приведены амплитуды ответа биосенсоров на присутствие БПЛ, то есть отношение интенсивности индуцированной люминесценции к контрольному уровню. Из представленных диаграмм следует, что генотоксичность БПЛ, регистрируемая биосенсорами pRecA-lux и pColD-lux, является результатом не только его прямого действия на ДНК, но и повышения в клетках бактерий уровня генотоксичных супероксид-радикала и перекиси водорода. При этом максимальный генотоксический эффект и образование супероксида наблюдается в концентрации БПЛ 0.0015 моль/л. При более высоких концентрациях БПЛ происходит падение уровня люминесценции биосенсоров, что может быть связано с токсическим действием БПЛ на бактерии.

Для уточнения этого явления были проведены эксперименты по одновременному определению люминесценции и выживаемости биосенсоров pSoxS-lux и pColD-lux непосредственно в инкубационной смеси в лунках планшета в зависимости от концентрации БПЛ. Для этого по истечении времени инкубации экспериментальной смеси замеряли интенсивность биолюминесценции. Затем аликвоту бактерий объемом 0.1 мл из каждой лунки серийно разводили в физиологическом растворе до 10^{-6} для последующего высева в чашки Петри с агаризованной питательной средой LB. Через 19 ч

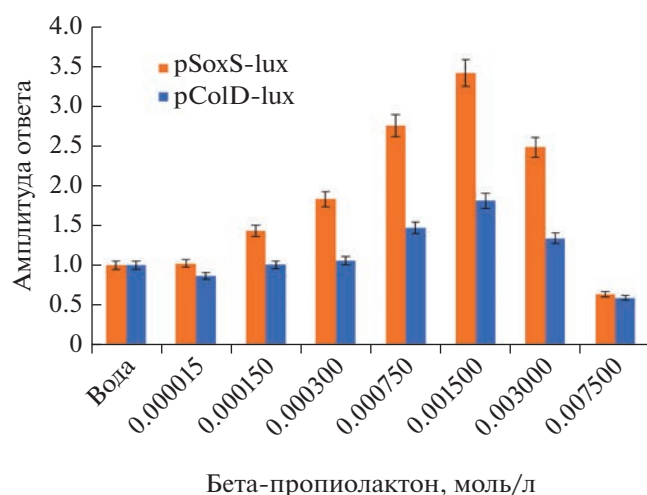


Рис. 1. Амплитуда ответа биосенсоров pSoxS-lux и pColD-lux на действие БПЛ.

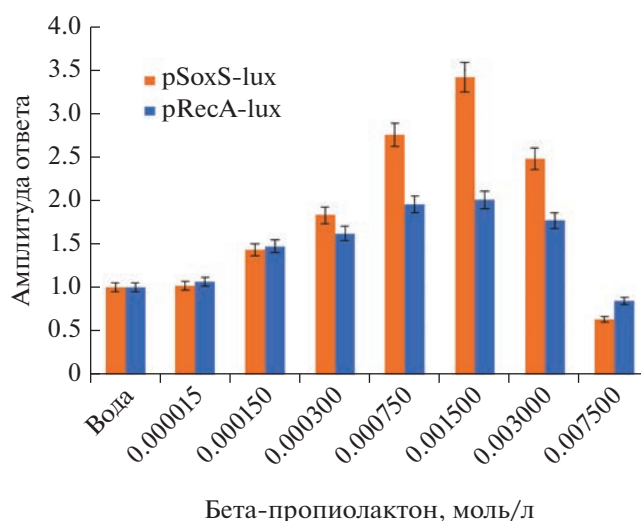


Рис. 2. Амплитуда ответа биосенсоров pSoxS-lux и pRecA-lux на действие БПЛ.

инкубации при 37°C учитывали число выросших колоний и пересчитывали на число колониеобразующих единиц в 0.1 мл суспензии бактерий.

В табл. 2 приведены количественные показатели интенсивности люминесценции биосенсоров pSoxS-lux и pColD-lux на 1000 колониеобразующих единиц (КОЕ), то есть на 1000 жизнеспособных бактерий. Было обнаружено, что БПЛ проявляет токсичность в исследованных концентрациях и снижает выживаемость бактерий по отношению к контрольному варианту на порядок в концентрации 0.0015 моль/л и на три порядка в концентрации 0.0075 моль/л. При этом интенсивность люминесценции биосенсоров возрастает в расчете на 1000 КОЕ. Так, интенсивность люминесценции биосенсоров pSoxS-lux и pColD-lux на 1000 КОЕ в концентрации БПЛ 0.0075 моль/л составила 21.8 и 13.3 в относительных единицах соответственно.

Для определения степени поврежденности ДНК бактерий при действии БПЛ и влияния на этот процесс антиоксиданта N-ацетилцистеина (АЦЦ) использовали метод электрофореза ДНК, выделенной

из бактерий биосенсора pSoxS-lux. БПЛ использовали в концентрациях 0.035 и 0.15 моль/л, а АЦЦ — в концентрациях 0.01 и 0.001 моль/л. В качестве чистого контроля служили бактерии, не подвергшиеся воздействию БПЛ и АЦЦ, а в качестве позитивного контроля — бактерии, обработанные диоксидом и перекисью водорода в концентрациях 0.0045 и 0.1 моль/л соответственно.

Из рис. 3 следует, что БПЛ в концентрации 0.15 моль/л (дорожка 7) вызывает разрывы ДНК более эффективно, чем в концентрации 0.035 моль/л (дорожка 4). АЦЦ в концентрации 0.001 моль/л не оказывал заметного влияния на уровень поврежденных ДНК, вызванных БПЛ (дорожки 3 и 6). Однако АЦЦ в более высокой концентрации 0.01 моль/л заметно снижал степень фрагментации ДНК бактерий (дорожки 3 и 6).

Для оценки генотоксичности БПЛ на эукариотах, использовали нематоду *Caenorhabditis elegans*, которая является хорошо изученным модельным объектом в различных генетических исследова-

Таблица 2. Зависимость выживаемости и интенсивности люминесценции бактерий биосенсоров pSox-lux и pColD-lux от концентрации БПЛ

Биосенсор	БПЛ, моль/л	Количество КОЕ	Люминесценция, отн. ед.	Люминесценция, на 1000 КОЕ, отн. ед.
pSoxS-lux	Контроль	1.1×10^8	11.78 ± 31	0.01
	0.0015	1.24×10^7	6047 ± 72	0.48
	0.0075	4.28×10^4	9.34 ± 37	21.8
pColD-lux	Контроль	9.66×10^7	905 ± 19	0.009
	0.0015	1.06×10^7	1935 ± 54	0.18
	0.0075	3.96×10^4	526 ± 13	13.3

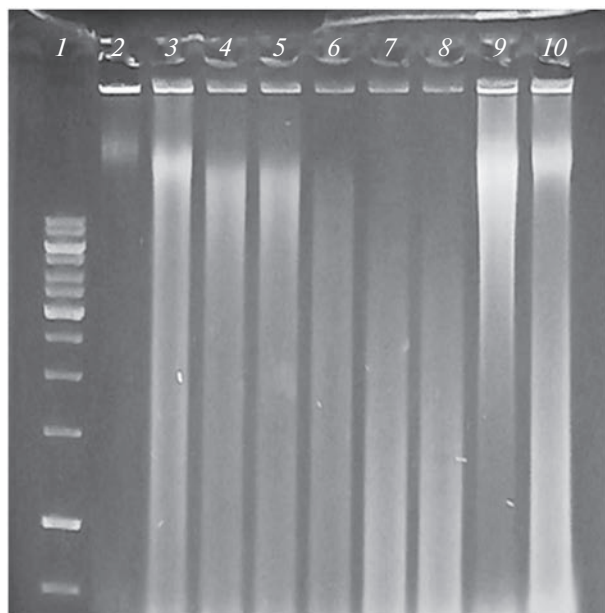


Рис. 3. Влияние N-ацетилцистеина на ДНК-повреждающую активность БПЛ в клетках биосенсора rSox-lux. 1 – маркер длин ДНК, 2 – негативный контроль (вода), 3 – БПЛ 0.035 + АЦЦ 0.01, 4 – БПЛ 0.035 + АЦЦ 0.001, 5 – БПЛ 0.035, 6 – БПЛ 0.15 + АЦЦ 0.01, 7 – БПЛ 0.15 + АЦЦ 0.001, 8 – БПЛ 0.15, 9 – диоксидин, 0.0045, 10 – перекись водорода, 0.1. Концентрации БПЛ, АЦЦ, диоксидина и перекиси водорода приведены в моль/л.

ниях. Нематоду на стадии развития L4 (young adult) подвергли воздействию БПЛ в различных концентрациях в течение 2 ч, после чего выделяли тотальную ДНК и определяли степень ее фрагментированности методом гель-электрофореза. На рис. 4 приведена электрофореграмма влияния БПЛ на целостность ДНК нематод. Видно, что БПЛ у нематод вызывает разрывы ДНК начиная с концентрации 0.0015 моль/л (дорожка 6). Наиболее эффективно повреждал ДНК нематоды БПЛ в концентрациях 0.0075 и 0.015 моль/л (дорожки 8 и 9). Следует отметить высокую генотоксичность перекиси водорода, использованной в качестве позитивного контроля в концентрации 0.1 моль/л. Антиоксидант АЦЦ в концентрациях 0.001 и 0.01 моль/л снижал ДНК-повреждающее действие БПЛ в клетках нематоды в наивысшей исследованной генотоксической концентрации 0.015 моль/л (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

БПЛ является высоко реакционноспособным агентом, молекула которого представляет собой четырехчленный цикл. После раскрытия цикла БПЛ приобретает электрофильные свойства и быстро вступает в реакцию с нуклеофильными центрами нуклеиновых кислот и белков.

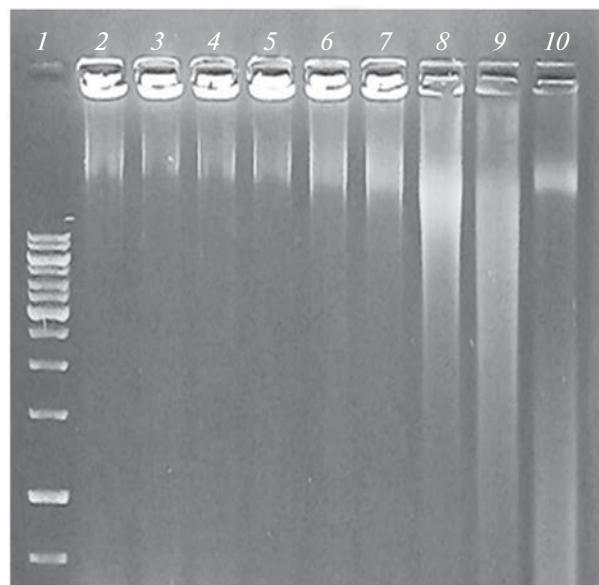


Рис. 4. Влияние БПЛ на целостность ДНК нематод *Caenorhabditis elegans*. 1 – маркер длин ДНК, 2 – контроль (вода), БПЛ в концентрациях (моль/л): 3 – 0.00015, 4 – 0.0003, 5 – 0.00075, 6 – 0.0015, 7 – 0.003, 8 – 0.0075, 9 – 0.015, 10 – перекись водорода, 0.1 моль/л.

Показательными в отношении генотоксичности БПЛ являются результаты, полученные на биосенсорах rRecA-lux и rColD-lux (табл. 1), демонстрирующие индукцию генов *recA* и *colD* в ответ на повреждения в ДНК бактерий. Это является следствием активации SOS-ответа, в котором важную роль играют наличие одностранных разрывов в ДНК (ssDNA) и продукты генов *recA* и *lexA*, последний из которых кодирует белок LexA, являющимся репрессором генов SOS-регулона. Промоторы генов *recA* и *colD* обеспечивают активацию начального и терминального этапов SOS-ответа соответственно. Ген *colD* активируется при наличии неудаленных на ранних этапах репарации повреждений ДНК. К ним относятся объемные аддукты, тиминовые димеры и межнитевые сшивки, приводящие к остановке репликации ДНК [22–24].

В наших экспериментах биосенсор rAlkA-lux не показал увеличения интенсивности люминесценции при действии БПЛ, тогда, как при действии ММС в концентрации 0.005 моль/л увеличил уровень своей люминесценции с 95 в контроле до 2998 усл. ед., то есть более, чем в 30 раз (табл. 1). Это указывает на то, что продукты взаимодействия БПЛ с ДНК отличаются от таковых монофункционального алкилирующего соединения – метилметансульфоната (ММС). Возможно, что БПЛ при взаимодействии с ДНК образует аддукты и сшивки, в отличие от ММС, который метилирует ДНК.

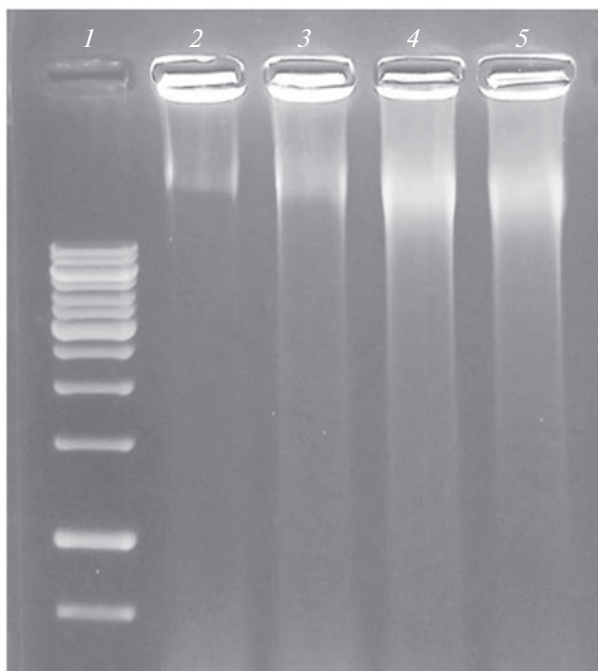


Рис. 5. Влияние антиоксиданта АЦЦ на ДНК-повреждающее действие БПЛ у нематод *Caenorhabditis elegans*: 1 – маркер, 2 – контроль (вода), 3 – БПЛ 0.015 + АЦЦ 0.01, 4 – БПЛ 0.015 + АЦЦ 0.001, 5 – БПЛ 0.015. Концентрации БПЛ и АЦЦ приведены в моль/л.

БПЛ, как и ММС, при воздействии на двуни-тевую ДНК в 70–80% случаев метилирует N7-по-зицию гуанина [5, 25]. N3-метиладенин, который является вторым по распространенности продук-том алкилирования ММС двуниевой ДНК, удаля-ется из нее 3-метиладенин-ДНК-гликозилазой – продуктом гена *adaA*, экспрессия которого кон-тролируется сенсорным белком Ada, являющим-ся регулятором транскрипции. Метилирование белка Ada ММС приводит к повышению его аф-финности к промоторным участкам Ada-регуло-на и превращает его в сильный транскрипцион-ный активатор [25–27].

Отсутствие генотоксического эффекта БПЛ на биосенсоре pAlkA-lux можно объяснить тем, его химическая структура отличается от таковой ММС. Генотоксичность БПЛ обусловлена продуктами (фрагментами) раскрытия его четырехчленного цикла, которые могут образовать преимущественно аддукты аддукты с белком Ada, приводящие к бло-кированию транскрипции Ada-регулона.

Ранее, при сравнительном изучении активнос-ти эпихлоргидрина (ЭХГ) и ММС на биосенсоре pAlkA-lux нами была обнаружена очень слабая индукция люминесценции ЭХГ, который пред-ставляет собой соединение, при раскрытии трех-членного цикла которого, образуется электро-фильный продукт. Максимальная интенсивность люминесценции при действии ЭХГ в concentra-

ции 0.3 моль/л, составила 285 отн. ед., что в 42 ра-за меньше люминесценции pAlkA-lux при дей-ствии ММС в концентрации 0.1 моль/л [28].

Самым неожиданным результатом оказалась индукция БПЛ экспрессии генов окислительного стресса *soxS* и *katG*, кодирующих ферменты су-пероксиддисмутазу и каталазу соответственно. В настоящей работе были использованы биосенсо-ры pSoxS-lux и pKatG-lux, которые несут рекомби-нантную плазмиду, содержащую промоторы гена супероксиддисмутаза *soxS* и гена каталазы *katG*. В бактериальной клетке промоторы этих генов находятся в заблокированном состоянии. При уве-личении концентрации супероксида или перок-сида выше физиологического уровня, они всту-пают в реакцию с соответствующими белками-активаторами и происходит разблокировка про-моторов, в результате чего lux-оперон транскри-бируется и биосенсоры люминесцируют. БПЛ в широком диапазоне концентраций от 0.000015 до 0.003 моль/л вызывал увеличение концентрации су-пероксид-аниона в бактериальных клетках. Увели-чение концентрации перекиси водорода наблю-дали только при высоких концентрациях БПЛ (0.0015 и 0.003 моль/л) (табл. 1). Полученные ре-зультаты однозначно указывают на способность БПЛ повреждать ДНК в клетках бактерий *E. coli* также и в результате индукции окислительного стресса.

Нами был проведен анализ сопряженности индукции БПЛ SOS-ответа у биосенсоров pResA-lux и pColD-lux и индукции экспрессии гена супероксиддисмутазы у биосенсора pSoxS-lux. Для этого определяли амплитуду ответа для каждого из использованных нами биосенсоров, то есть отношения величины люминесценции в опытных вариантах к таковому в контрольных вариантах (рис. 1, 2).

В наших экспериментах БПЛ наиболее интенсивно индуцировал SOS-ответ у биосенсоров pResA-lux и pColD-lux в концентрациях, характерных для наиболее эффективной индукции люминесценции у биосенсора pSoxS-lux (рис. 1, 2). Однако с увеличением концентрации БПЛ (более 0.001 моль/л) происходит снижение выживаемости бактериальных клеток, что, как выявил электрофоретический анализ, сопровождается деградацией ДНК бактерий (рис. 3). Интенсивность свечения биосенсора pColD-lux свидетельствует об уровне повреждений ДНК под действием свободных радикалов, инициированных супероксидом в клетках бактерий. Если нормировать количественные показатели интенсивности люминесценции pColD-lux на 1000 КОЕ, т.е. на 1000 жизнеспособных бактерий, то мы видим, что уровень ответа, характеризующий уровень SOS-репарации ДНК у жизнеспособных бактерий, от увеличения концентрации БПЛ не падает, а возрастает (табл. 2). Подобное повышение уровня SOS-ответа у жизнеспособных бактерий наблюдали после воздействия диоксида и параквата [29, 30]. Падение выживаемости бактерий связано с увеличением степени поврежденности ДНК, о чем свидетельствуют результаты электрофоретического анализа целостности ДНК бактерий (рис. 3). Из электрофореграмм видно, что деградация ДНК усиливается с увеличением концентрации БПЛ и снижается при совместном использовании БПЛ и антиоксиданта АЦЦ. Последний в наших экспериментах снижал уровни индукции БПЛ как SOS-ответа, так и экспрессии супероксиддисмутазы, инактивирующей супероксидный радикал, в бактериальных клетках (рис. 1, 2).

Нематода *Caenorhabditis elegans* привлекает внимание исследователей в качестве объекта для изучения токсических и генотоксических свойств химических веществ. Это связано с тем, что она является многоклеточным эукариотическим организмом и обладает системой биотрансформации химических соединений, аналогичной у млекопитающих [31, 32]. В наших экспериментах БПЛ при воздействии на нематод в диапазоне концентраций 0.00015–0.015 моль/л в течение 2 ч вызывал разрывы ДНК начиная с концентрации 0.0015 моль/л (рис. 3). В свою очередь, антиоксидант АЦЦ снижал ДНК-повреждающую активность БПЛ в клетках нематоды (рис. 4, 5). Результаты, полученные на

бактериальных биосенсорах, были подтверждены на нематодах.

Таким образом, впервые показано, что ДНК-повреждающая активность БПЛ связана не только с его способностью связываться с ДНК бактерий, но и со способностью генерировать в клетке такие генотоксичные формы кислорода как супероксид-анион и перекись водорода. Обнаружено, что БПЛ дозо-зависимым образом, начиная с концентрации более 0.001 моль/л, одновременно снижает выживаемость бактерий и увеличивает интенсивность экспрессии гена антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы *soxS* и гена репарации ДНК *colD*. В клетках нематод БПЛ индуцировал разрывы ДНК, выявляемые методом электрофореза. Антиоксидант АЦЦ (ацетилцистеин) снижал генотоксические эффекты БПЛ как у бактерий, так и у нематод.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта людей.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanders B., Koldijk M., Schuitemaker H. Inactivated viral vaccines // Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. P. 45–80.
2. Lawrence S.A. Beta-Propiolactone: Viral inactivation in vaccines and plasma products. // PDA J. Pharm Sci. and Technol. 2000. V. 54. P. 209–214.
3. Курашова С.С., Ишмухаметов А.А., Егорова М.С. и др. Сравнительная характеристика инактивирующих агентов для создания вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018. Т. 17. № 4. С. 26–29.
<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29>
4. Colburn N.H., Richardson R.G., Boutwell R.K. Studies of the reaction of β -propiolactone with deoxyguanosine and related compounds // Biochem. Pharmacol. 1965. V. 14. P. 1113–1118.
5. β -Propiolactone // IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: 1999. V. 71. P. 1103–1118.
6. Perrin P., Morgeaux S. Inactivation of DNA by β -propiolactone // Biologicals. 1995. V. 23. P. 207–211.
7. Taubman M.A., Atassi M.Z. Reaction of beta-propiolactone with aminoacids and its specificity for methionine // Biochem J. 1968. V. 106. P. 829–834.
<https://doi.org/10.1042/bj1060829>

8. Lawley P.D., Brookes P. Further studies on the alkylation nucleic acids and their constituent nucleotides // Biochem. J. 1963. V. 89. P. 127–138.
<https://doi.org/10.1042/bj0890127>
9. Penman B.W., Hoppe H., Thilly W.G. Concentration-dependent mutation by alkylating agents in human lymphoblasts and *Salmonella typhimurium*: N-methyl-N-nitrosourea and beta-propiolactone // J. Natl Cancer. Inst. 1979. V. 63. P. 903–907.
10. Kortselius M.J. Induction of sex-linked recessive lethals and autosomal translocations by beta-propiolactone in *Drosophila*: Influence of the route of administration on mutagenic activity // Mut. Res. 1979. V. 66. P. 55–63.
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(79\)90007-7](https://doi.org/10.1016/0165-1218(79)90007-7)
11. Shamberger R.J., Corlett C.L., Beaman D., Kasten B.L. Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and beta-propiolactone. Part IX. Antioxidants and cancer // Mut. Res. 1979. V. 66. P. 349–355.
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(79\)90045-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(79)90045-4)
12. Benning V., Brault D., Duvinage C. et al. Validation of the *in vivo* CD1 mouse splenocyte micronucleus test // Mutagenesis. 1994. V. 9. P. 199–204.
<https://doi.org/10.1093/mutage/9.3.199>
13. Klein C.B., Rossman T.G. Transgenic Chinese hamster V79 cell lines which exhibit variable levels of gpt mutagenesis // Envir. Mol. Mutagen. 1990. V. 16. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1002/em.2850160102>
14. Brusick D. The genetic properties of β -propiolactone // Mut. Res. 1976. V. 39. P. 241–255.
15. Santaló J., Estop A.M., Egozcue J. Genotoxic effect of beta-propiolactone on mammalian oocytes // Mut. Res. 1987. V. 189. P. 407–416.
[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90050-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90050-4)
16. Brault D., Renault D., Tombolan F., Thybaud V. Kinetics of induction of DNA damage and lacZ gene mutations in stomach mucosa of mice treated with beta-propiolactone and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, using single-cell gel electrophoresis and MutaMouse models // Envir. Mol. Mut. 1999. V. 34. P. 182–189.
17. Snyder C.A., Garte S.J., Sellakumar A.R., Albert R.E. Relationships between the levels of binding to DNA and the carcinogenic potencies in rat nasal mucosa for three alkylating agents // Cancer Lett. 1986. V. 33. P. 175–181.
[https://doi.org/10.1016/0304-3835\(86\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0304-3835(86)90022-4)
18. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16–25.
<https://doi.org/10.1134/S0003683810080089>
19. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В. Сенсорные биолуминесцентные системы на основе lux-оперонов для детекции токсичных веществ // Хим. физика. 2012. Т. 31. № 10. С. 15–20.
20. Meneely P.M., Dahlberg C.L., Rose J.K. Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism // Curr. Protocols Essential Lab. Techniques. 2019. V. 19. P. e35.
<https://doi.org/10.1002/cpet.35>
21. Imanikia S., Galea F., Nagy E. et al. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Envir. Toxicol. Pharmacol. 2016. V. 7(45). P. 356–361. Epub 2016 Jun 20.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.06.020>
22. Завильгельский Г.Б. SOS-репарации 60 лет // Мол. биология. 2013. Т. 47. № 5. С. 699–706.
<https://doi.org/10.7868/S0026898413050224>
23. Maslowska K.H., Makiela Dzbenska K., Fijalkowska I.J. The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage // Envir. Mol. Mutagenesis. 2019. V. 60. № 4. P. 368–384.
<https://doi.org/10.1002/em.22267>
24. Baharoglu Z., Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions // FEMS Microbiol. Rev. 2014. V. 38. № 6. P. 1126–1145.
<https://doi.org/10.1002/em.22267>
25. Sedgwick B., Bates P.A., Paik J. et al. Repair of alkylated DNA: Recent advances // DNA Repair. 2007. V. 6. № 4. P. 429–442.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.005B>
26. Mielecki D., Grzesiuk E. Ada response – a strategy for repair of alkylated DNA in bacteria, FEMS // Microbiol. Lett. 2014. V. 355. № 1. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1111/1574-6968>
27. Mielecki D., Wrzesiński M., Grzesiuk E. Inducible repair of alkylated DNA in microorganisms // Mut. Res. 2015. V. 763. P. 294–305.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.12.001>
28. Орджоникидзе К.Г., Игонина Е.В., Жошибекова Б.С., Абилов С.К. Сравнительное изучение ДНК-повреждающей активности эпихлоргидрина с помощью биосенсоров *Escherichia coli* и методом ДНК-комет на мышцах // Генетика. 2021. Т. 57. № 9. С. 1031–1038.
<https://doi.org/10.31857/S0016675821090083>
29. Мачигов Э.А., Игонина Е.В., Свиридова Д.А. и др. Изучение токсичности и генотоксичности параквата для бактерий помощью lux-биосенсоров *Escherichia coli* // Рад. биология. Радиоэкология. 2022. Т. 62. № 3. С. 240–249.
<https://doi.org/10.31857/S0869803122030055>
30. Свиридова Э.А., Мачигов Е.В., Игонина и др. Изучение механизма генотоксичности диоксида с помощью lux-биосенсоров *Escherichia coli* // Рад. биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60. № 6. С. 595–603.
<https://doi.org/10.31857/S0869803120060223>
31. Hartman J.H., Widmayer S.J., Christina M. et al. Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans* // J. Toxicol. Envir. Health. 2021. Part B. V. 24(2). P. 51–94.
<https://doi.org/10.1080/10937404.2021.1884921>
32. Harlow P.H., Perry S.J., Alexander J. et al. Comparative metabolism of xenobiotic chemicals by cytochrome P450s in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Nat. Sci. Reports. 2018. V. 8. P. 13333.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31215-w>

Study of the Genotoxicity of Beta-Propiolactone Using *E. coli* lux Biosensors and Nematode *Caenorhabditis elegans*

E. A. Machigov^a, S. K. Abilev^{a, b, *}, E. V. Igonina^a, and M. V. Marsova^b

^aVavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bLomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: abilev@vigg.ru

For the first time, lux biosensors of *E. coli* and the nematode *Caenorhabditis elegans* were used to study the genotoxicity of beta-propiolactone (BPL) used in the production of inactivated viral vaccines as an inactivator. It has been shown that the DNA-damaging activity of BPL is due not only to its ability to bind to bacterial DNA, but also to the ability to generate in the cell such reactive oxygen species as superoxide anion and peroxide, which have genotoxic activity. It was found that BPL in a dose-dependent manner, starting from a concentration of 0.001 mol/L, reduces the survival of bacteria. However, the intensity of expression of the antioxidant defense gene of superoxide dismutase *soxS* and the DNA repair gene *colD* increased. BPL induced DNA breaks in nematode cells detected by electrophoresis. The antioxidant acetylcysteine (ACC) reduced the genotoxic effects of BPL on both bacteria and nematode.

Keywords: beta-propiolactone, lux-biosensors, *E. coli*, nematode *Caenorhabditis elegans*, genotoxicity, superoxide anion, DNA breaks, antioxidant, acetyl cysteine.